# 过氧化氢（H2O2）含量检测试剂盒（微量法）
# （本试剂盒仅供科研使用）

## 产品包装

| 产品编号 | 产品名称 | 产品规格 |
|---|---|---|
| YFX0564 | 过氧化氢（H2O2）含量检测试剂盒（微量法） | 100 管/96 样 |

## 产品内容

| 名称 | 规格 | 储存条件 |
|---|---|---|
| 试剂一 | 丙酮 100mL ×1 瓶 （自备） | 4℃ |
| 试剂二 | 粉剂 ×1 瓶：临用前加入 5mL 浓盐酸充分溶解备用。用不完的试剂可 4℃保存 1 个月；(溶解时间较长，约 30min，可 40℃-60℃加热溶解，务必提前准备)。 | 4℃，避光 |
| 试剂三 | 液体 5mL ×1 瓶 | 4℃，避光 |
| 试剂四 | 液体 25mL ×1 瓶 | 4℃，避光 |
| 标准品 | 液体 ×1 瓶：临用前加入 1.98mL 蒸馏水，充分混匀，即为 100μmoL/mL H2O2 母液（建议 3 天内用完）。 | 4℃，避光 |

## 一、产品说明

H2O2 是生物体内最常见的活性氧分子，主要由 SOD 和 XOD 等催化产生，由 CAT 和 POD 等催化降解。H2O2 不仅是重要的活性氧之一，也是活性氧相互转化的枢纽。一方面，H2O2 可以直接或间接地氧化细胞内核酸，蛋白质等生物大分子，并使细胞膜遭受损害，从而加速细胞的衰老和解体；另一方面 H2O2 也是许多氧化应急反应中的关键调节因子。

H2O2 与硫酸钛生成黄色的过氧化钛复合物，在 415nm 有特征吸收。

## 二、自备材料

酶标仪、通风橱、电子天平、台式离心机、可调式移液器、96 孔板（需使用 PTFE 或 PP 材质）、震荡仪、研钵、蒸馏水、丙酮、浓盐酸。

## 三、样品准备

1、组织：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆；转移至 EP 管中，12000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、细胞/细菌：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（$10^4$ 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 300W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min）；12000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

3、液体样本：取 100μL 液体样本，加入 900μL 试剂一，8000g 4℃离心 10min，取上清。

## 四、操作步骤

**正式测定前，必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。**

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 415nm，蒸馏水调零。

2、将试剂二、三和四 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min 以上。

3、用丙酮将母液梯度稀释为标准稀释液（如 1、2、4、6μmoL/mL），按照下表操作：

| 试剂名称（μL） | 测定管 | 标准管 | 空白管 |
|---|---|---|---|
| 样本 | 200 | | |
| 标准稀释液 | | 200 | |
| 试剂一 | | | 200 |
| 试剂二 | 25 | 25 | 25 |
| 试剂三 | 50 | 50 | 50 |
| 充分混匀，4000g，25℃离心 5min，弃上清，留沉淀（含色素样本，建议用丙酮清洗 3-5 次，去除色素）。 | | | |
| 试剂四 | 250 | 250 | 250 |
| 充分震荡溶解沉淀后，取 200μL 转移至 96 孔板中，测定 415nm 处吸光值，记为 A 测定、A 标准、A 空白。计算ΔA 测定 = A 测定-A 空白，ΔA 标准 = A 标准-A 空白。<br>**标准管和空白管仅需测定 1-2 次。** | | | |

## 五、H2O2 含量的计算

测定的回归曲线，y = 0.2471x -0.0089，$R^2$=0.9999，x 为标准品浓度，μmoL/mL；y 为吸光值。

1、按照组织蛋白浓度计算

$H_2O_2$ 含量(μmoL/mg prot)=(ΔA+0.0089) ÷0.2471×V 样÷(V 样÷V 提×Cpr)

=4.05×(ΔA+0.0089) ÷Cpr。

需要另外测定蛋白浓度，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

2、按照样本鲜重计算

$H_2O_2$ 含量(μmoL/g 鲜重)=(ΔA+0.0089) ÷0.2471×V 样÷(V 样÷V 提×W)

=4.05×(ΔA+0.0089) ÷W。

3、按照细菌/细胞密度计算

$H_2O_2$ 含量(μmoL/$10^4$ ceLL)=(ΔA+0.0089) ÷0.2471×V 样÷(V 样÷V 提×500)

= 0.008×(ΔA+0.0089)。

4、按照液体体积计算

$H_2O_2$ 含量（μmoL/mL）= 10×(ΔA+0.0089)÷0.2471×V 样÷V 样 =40.47×(ΔA+0.0089)。

V 样：加入反应体系中样本体积，0.2mL；V 提：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万；10：液体样本稀释倍数（100μL 液体样本+90μL 试剂一）。

## 六、注意事项

1、 线性范围为 0.01-1.2，可测定 H2O2 浓度范围为 0.08-5μmoL/mL，如果样本ΔA 大于 1.2，建议适当稀释待测样本后重新测定（计算公式中乘以相应稀释倍数），如果ΔA 小于 0.01，建议适当增加样本量。

2、 本试剂盒所有试剂均有较高挥发性，建议用完后立即密封，减少浪费损失。

3、 丙酮和试剂三均含有刺鼻性气味，需在通风橱中进行操作，并做好防护措施；测定过程中加入试剂三时需沿管壁缓慢滴加，防止液体喷溅。

4、 丙酮会溶解普通塑料吸头，建议使用耐丙酮 PP 吸头，同时快速吸液、加样，减少丙酮在吸头内挥发产气造成缺量。

5、 为防止对设备造成损害，禁止使用聚苯乙烯（PS）等易被强酸腐蚀材质的 96 孔板。

6、 过氧化氢为氧化剂，禁止将高浓度过氧化氢母液直接接触丙酮和强酸，以造成爆炸风险。